



JOURNAL OF THE
*Selva Andina
Biosphere*
Official Journal of the Selva Andina Research Society

Artículo de Investigación

ISSN 2308-3867 (print edition)
JSAB
ISSN 2308-3859 (online edition)

Evaluación de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion®) como inductores de resistencia a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en Ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones controladas

Evaluation of *Trichoderma* spp. and Acibenzolar-S-Methyl (Bion®) as resistance inducers in Garlic (*Allium sativum* L.) against white rot *Sclerotium cepivorum* Berk. under controlled conditions

Jiménez María A¹, Arcia M. Asdrubal², Ulacio Dilcia¹, Hernández Alexander¹, Méndez Nailéth¹

Datos del Artículo

¹Centroccidental Lisandro Alvarado, Laboratorio de Fitopatología, Estado Lara Venezuela.

²Universidad Central de Venezuela, estado Aragua, Venezuela. Laboratorio de Biología Molecular de la UCLA – Apartado 400 3001 Lara. Venezuela Telf. (0251) 259.2490-259.2493. Fax. (0251) 259.2571. arcia.asdrubal@gmail.com dilciau@ucla.edu.ve ahernandez@ucla.edu.ve nailethmendez@ucla.edu.ve

*Dirección de contacto:

María A Jiménez. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Laboratorio de Fitopatología, estado Lara Venezuela. Apartado 400 3001 Lara. Venezuela Telf. (0251) 259.2490 – 259.2493. Fax. (0251) 259.2571. Correo electrónico: mjimeneztamayo@gmail.com.

Palabras clave:

Resistencia inducida, peroxidases, polifenol oxidases, β-1,3-glucanases, proteínas PR.

J Selva Andina Biosph.
2013; 1(1):2-15.

Historial del artículo

Recibido junio, 2013.
Devuelto octubre 2013
Aceptado noviembre, 2013.
Disponible en línea, noviembre 2013

Editado por:
*Selva Andina
Research Society*

Key words:

Induced resistance, peroxidases, polyphenoloxidases, β-1,3-glucanases, PR proteins

Resumen

Para determinar el efecto de *Trichoderma koningiopsis* y Bion® como inductores de resistencia sistémica a la pudrición blanca del ajo causada por *Sclerotium cepivorum*, se estableció un ensayo bajo condiciones controladas. El experimento se realizó bajo un diseño en bloques al azar para un total de ocho tratamientos con cuatro repeticiones por tratamiento. Se determinó sobre tejido foliar las actividades enzimáticas peroxidases, polifenol oxidases y β-1,3-glucanases así como la expresión isoenzimática de peroxidases. Los resultados mostraron que los cambios en las fracciones proteicas de las plantas tratadas con los inductores evidenciaron que la resistencia inducida fue expresada tanto a nivel local como sistémica. Las alternativas donde se emplearon los elicitores de forma combinada, lograron inducir la expresión de las enzimas peroxidases, polifenol oxidases y glucanases a los 5 y 9 dpi revelando que esos períodos son cruciales para la activación de los mecanismos de defensa. La expresión de los perfiles electroforéticos mostraron que la respuesta defensiva de la planta cuando se emplearon el inductor biótico y abiótico fue más intensa y perduró por mayor tiempo cuando se comparó con las plantas tratadas con el químico solo. Se requiere de investigaciones adicionales para determinar si la IR provocada por los inductores usados pueden ser superados con otras dosis, compuestos y momentos de aplicación y si dichas respuestas están influenciadas por el genotipo del hospedante y/o las condiciones ambientales.

© 2013. Journal of the Selva Andina Biosphere. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

To evaluate the effect of *Trichoderma koningiopsis* and Bion® to induce systemic resistance to white rot caused by *Sclerotium cepivorum* in garlic, an experiment was set under controlled conditions using a randomized block design for a total of eight treatments with four replicates per treatment. Enzyme activities of peroxidases, polyphenol oxidases and β-1,3-glucanases and peroxidase isozyme expression were determined on leaf tissue. The results showed that changes in the protein fractions of treated plants indicated that the induced resistance was expressed both locally and systemically. Alternatives where elicitors were used in combination were able to induce the expression of enzymes peroxidases, polyphenol oxidases and glucanases at 5 and 9 dpi revealing that these periods are crucial for the activation of defense mechanisms. The expression of the electrophoretic profiles showed that plant defensive response when the inductor is used biotic and abiotic was more intense and persisted for a longer time when compared with plants treated with the chemical one. Further research is required to determine whether the IR used can be overcome by other doses, compounds and application times and if such responses are influenced by the genotype of the host and / or environmental conditions.

© 2013. Journal of the Selva Andina Biosphere. Bolivian. All rights reserved.

Introducción

La pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk, una de las enfermedades que ocasiona en Venezuela las pérdidas más significativas en el cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) (Moreno & Acevedo 2002). La incidencia de la enfermedad difiere de una región a otra y tales variaciones se han atribuido a diferentes condiciones climáticas (Brix & Zinkernagel 1992), al uso de prácticas agronómicas, presencia de antagonistas en el suelo, variabilidad patogénica del hongo y susceptibilidad del hospedante (Sánchez-Pale *et al.* 2002).

La reducción en la incidencia de la pudrición blanca se ha logrado mediante el uso de fungicidas (Delgadillo *et al.* 2002), técnica poco práctica y controversial desde el punto de vista ambiental, por ello se ha propuesto el uso de métodos alternativos y sostenibles para el manejo de la pudrición blanca, como el empleo del hongo antagonista *Trichoderma* spp. que ha logrado controlar al patógeno *in vitro* y disminuir la enfermedad bajo condiciones controlados, y de campo, debido a su acción directa sobre el patógeno (Obregón 2001, Clarkson *et al.* 2006, Coventry *et al.* 2006, Jiménez *et al.* 2012). Por otra parte, este hongo antagonista ha permitido regular algunas enfermedades de manera indirecta mediante la estimulación de las respuestas de defensa de la planta y la resistencia de los cultivos (Harman *et al.* 2004, Chacón *et al.* 2007, Segarra *et al.* 2008), mecanismo conocido como Resistencia Sistémica Inducida (RSI) por agentes bióticos (Shoreh & Harman 2008).

La promoción de las respuestas defensivas de las plantas ante las enfermedades se ha logrado también mediante la aplicación de inductores quími-

cos como el compuesto Acibenzolar-S-metilo (Bion®) que ha brindado protección a los cultivos, constituyendo una estrategia preventiva que promueve la RSA (Gorlach *et al.* 1996, Cavalcanti & Resende 2005)

El modo de acción a nivel bioquímico de los inductores de resistencia tanto biológicos como químicos, consiste en la activación de genes que codifican una serie de enzimas involucradas en la síntesis de lignina y aquellas con efecto antimicrobiano directo como las peroxidasas, polifenoloxidasas y fitoalexinas (Resende *et al.* 2000).

También, promueven la síntesis de proteínas relacionadas con el proceso de patogénesis (proteínas PR), las enzimas α -1,3glucanasas, quitinasas contribuyen a la resistencia (Van Loon & Van Strien 1999), por ello, estos compuestos se utilizan como marcadores bioquímicos y moleculares para determinar el inicio e intensidad de la respuesta de defensa en la planta (Van Loon & Van Strien 1999, Durrant & Dong 2004).

Las respuestas defensivas de las plantas de ajo (*Allium sativum* L) a la pudrición blanca, la utilización de marcadores bioquímicos constituyen una herramienta para evaluar el efecto de los inductores y el lapso en el que se observan las respuestas, que permite programar un manejo integrado de la enfermedad de un cultivo. Por lo anterior, la presente investigación planteó como objetivo evaluar mediante marcadores bioquímicos el efecto de *Trichoderma koningiopsis* y Bion® como inductores de resistencia a la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* L) producida por *Sclerotium cepivorum*, bajo condiciones controladas.

Materiales y métodos

Ubicación del ensayo, el estudio se llevó a cabo en los Laboratorios Expertabiol de la Universidad Central de Venezuela Maracay, estado Aragua, y los Laboratorios de Fundamentos Fitopatológicos y de Biología Molecular del Posgrado de Fitopatología de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” Barquisimeto estado Lara.

Estudios Bioquímicos, para el ensayo, se emplearon semillas-diente de ajo “greladas” de apariencia sana, sin manchas o lesiones sobre su superficie, provenientes de un ensayo de campo previo llevado a cabo en una parcela destinada a la siembra de ajo en la población de Agua Negra, perteneciente al Municipio Jiménez del Estado Lara. Fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por un minuto y se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada (ADE) (Diekmann 1997). Seguidamente fueron sembradas en bandejas de germinación de 26 cm de ancho x 53 cm de largo y 6 cm de altura contentivas de 50 g de sustrato orgánico por celda previamente esterilizado con vapor, para asegurar las condiciones asépticas, colocado en un envase de metal de 150 L de capacidad, con una tapa perforada sometido a una temperatura entre 80 ± 90 °C sobre una estructura que deja pasar vapor de agua, durante 4 h (Nelson 1999). Las bandejas se colocaron bajo un diseño en bloques al azar para un total de ocho tratamientos con cuatro repeticiones por tratamiento, quedando conforma dos de la siguiente forma: Testigo absoluto (Tes), sin microorganismo ni inductor químico, aplicación de *S. cepivorum* (S), aplicación de *T. koningiopsis* (T), aplicación de Bion® (B), *S. cepivorum* + *T. koningiopsis* (ST), *S. cepivorum* + Bion® (SB), *T. koningiopsis* + Bion® (TB) y *S. cepivorum* + *T. koningiopsis* + Bion®

(STB). Para un total de ocho bandejas, con un tratamiento cada una y 20 plantas por tratamiento.

Obtención de la suspensión de T. koningiopsis, como inductor de resistencia se utilizó el hongo *T. koningiopsis* proveniente de la colección del laboratorio de EXPERTABIOL. Se prepararon cultivos puros del microorganismo de 8 días de crecimiento bajo condiciones asépticas sobre medio papa dextrosa agar (PDA) al 1.5 %, pH 6.5 en cajas Petri, de 9 cm de diámetro esterilizadas en autoclave eléctrico de 40 L. de capacidad marca Sterilizer SM200® durante 20 min a 15 lb de presión (121 °C). Para ello se inocularon en la parte central cuatro cajas con un disco de micelio de 5 mm de diámetro provenientes de los márgenes del medio de cultivo. Seguidamente, se colocaron sobre un mesón bajo condiciones de laboratorio (temperatura promedio de ± 28 °C, humedad relativa de 65%) donde permanecieron durante 6 días, al final de los cuales, se seleccionaron las cajas incrementadas que mostraron mejor crecimiento y con ellas se preparó la suspensión de conidias, agregando 10 mL de (ADE), a cada caja, haciendo un raspado de la colonia con una varilla de vidrio esterilizada para que las conidias quedaran en la suspensión y finalmente, se ajustó la concentración a 3×10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro UFC/mL (Cañedo & Ames 2004). El inóculo del biocida se aplicó mediante la técnica de inmersión propuesta por Fernández-Larrea (2001), que consiste en sumergir semillas sanas durante 20 min en la suspensión de conidias preparada. Posteriormente, las semillas se retiraron, colocándose en papel absorbente esterilizado para retirar el exceso de agua. Las semillas testigo fueron sumergidas en una solución de ADE. A continuación, se sembraron como se describió anteriormente y el hongo inductor fue nuevamente

aplicado en igual dosis que la inicial, con un volumen de 5 mL por planta a los 15 días después de la siembra (dds).

El producto comercial Bion® (Acibenzolar-S-methyl, WG. 500 Syngenta Crop Protection Pty Ltd) se aplicó con una dosis de 7.5 g de ingrediente activo (g i.a) 100 L⁻¹ de agua con un volumen de 5 mL por planta a los tres días posteriores a la aplicación de *T. koningiopsis*, en igual dosis inicial y a los 15 dds.

El hongo patógeno fue obtenido a partir de los esclerocios provenientes de plantas afectadas por la enfermedad que fueron desinfestados con alcohol etanol al 90% durante un minuto con tres pases por ADE (Papavizas 1972). Una vez secos, se colocaron con una pinza hundiéndolos en discos de 5 mm de diámetro de agar-agua acidificado con ácido láctico al 3% para impedir el crecimiento de bacterias y colocados en cápsulas de petri de 9 mm de diámetro. Una vez germinados aproximadamente entre los 9 y 10 días después de colocarlos en el medio, el micelio que emergió fue transferido a medio de cultivo PDA esterilizado en iguales condiciones. La inoculación fue realizada a los 3 días posteriores a la aplicación de los inductores (dpi), mediante un disco de 5 mm de diámetro tomados con un sacabocados desde los márgenes de cultivos de 14 días de desarrollo con aproximadamente 3 esclerocios por disco.

Todos los tratamientos se mantuvieron bajo condiciones de umbráculo hasta el 20 dpi cuando se tomaron las muestras.

Obtención y almacenamiento de las muestras de tejido foliar, para realizar el análisis de las actividades enzimáticas, se colectaron las hojas de las plantas provenientes de cada tratamiento, de 3 hasta el 20 dpi. Dichas muestras se pesaron y almacenaron en papel de aluminio para evitar la degra-

dación enzimática, se transportaron inmediatamente hasta el laboratorio para su almacenamiento a -20 °C, hasta su procesamiento.

Extracción de enzimas, el material vegetal se colocó en un mortero, se le agregó nitrógeno líquido y se maceró hasta su totalidad. El producto del macerado se homogenizó con amortiguador de extracción Buffer fosfato de potasio 50 mM pH 5.7 conteniendo polivinilpirrolidona (PVP) al 1%, EDTA 1mM y β-mercaptoetanol 10 mM, en proporción 1:1 (p/v), manteniendo una temperatura entre 0 a 4 °C durante todo el procesamiento de las mismas. Posteriormente el extracto vegetal fue centrifugado a 4 °C durante 20 min a 12000 rpm, con el sobrenadante obtenido se realizaron las determinaciones de proteínas totales (PT), Bradford (1976), realizando las lecturas de absorbancia a 595 nm del complejo proteína-Azul de Coomassie G-250, en espectrofotómetro (Genesys UV 10™) a partir de una solución patrón de 1mg.mL⁻¹ de albúmina de suero bovino (ASB). El resto del extracto obtenido fue distribuido en alícuotas de aproximadamente 100 µl y preservado a -20 °C, para ser utilizado posteriormente en la determinación de las enzimas.

Actividad enzimática de peroxidasa, la cuantificación de la actividad de la peroxidasa (POX) se realizó por método espectrofotométrico directo descrito por Frick (1976), se utilizaron como sustratos el guayacol y el peróxido de hidrogeno (H₂O₂), se determinó la velocidad de la reacción de oxidación del guayacol por la enzima POX, en presencia de H₂O₂, midiendo la absorbancia a 470 nm (zona del espectro donde absorbe el guayacol oxidado). Para la lectura, se incubaron las muestras a 30 °C durante 20 min, se adicionaron 50 µL de extracto enzimático a una mezcla de reacción que consistió en: 450 µL tampón fosfato de pota-

sio pH 7.5, 1.25 mL de Guayacol 20 mM y 1.25 mL de H₂O₂ al 30%. El blanco consistió en una mezcla de guayacol, tampón y H₂O₂ sin la muestra. Se tomó la variación de densidad óptica (DO) en el tiempo (t), durante un minuto a intervalos de 5 seg realizando tres repeticiones por tratamiento. El cálculo de la actividad enzimática general fue expresado en: mmoles (mM) de producto formado (purpurogalina) por minuto (min) por microgramos (µg) de proteína y fue calculado mediante la expresión:

Actividad enzimática POX = $(x /) * (1 / t) * (v. r / v. m) * 1 / PT * dil.$

Dónde:

x: es la pendiente de la recta de regresión de los datos de cada repetición.

: es el coeficiente de extinción molar de la enzima expresada en mM⁻¹ cm⁻¹.

t: tiempo en que se realizaron las lecturas.

v.r: Volumen total de la reacción.

v.m: Volumen de la muestra

PT: proteínas totales calculadas expresadas en mg

dil: dilución

Adicionalmente, la actividad enzimática POX, se determinó, mediante una separación electroforética, de los diferentes extractos de muestras tomadas a los 10 y 15 dpi. En cada pocillo se depositó 15 µL del sobrenadante y una gota de Azul de bromofenol al 0,1% para marcar el frente de la corrida. Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de Poliacrilamida (PAGE discontinuo) en condiciones nativas, de acuerdo con Laemmli (1970), en un sistema de buffers discontinuos, Tris-HCL 0.75 M pH 6.8 para el gel concentrador de Acrilamida al 6 % y Tris-HCL 2.25 M pH 8.8 para el separador de acrilamida al 12% adaptado para electroforesis vertical en equipo cámaras del tipo mini dual-vertical (marca SIGMA). La elec-

troforesis se desarrolló a 12 °C durante 4 h, con un voltaje inicial de 50 V durante 30 min y un voltaje final de 180 V. Para tinciones específicas, el gel se sumergió en una solución de revelado para POX, colocando el gel en una solución 100 mL de Sodio acetato a pH 5 (4 °C), 100 µg CaCl₂, 6 mL de Carbazole y 2 µL N,N-dimetilformamida (DMF) hasta la aparición de las bandas. El ensayo se repitió tres veces.

El estudio de sistemas de POX implicados en la respuesta defensiva de la planta por las diferentes aislados a los 10 y 15 dpi fue establecido con base en el número, la posición e intensidad relativa de la tinción de cada banda, para ser utilizados como marcadores bioquímicos en la comparación de los tratamientos que provocaron en mayor o menor grado y la duración de la respuesta defensiva por parte del hospedante.

Actividad enzimática de polifenol oxidasa, la cuantificación de la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) se determinó mediante del método continuo descrito por Alexander (1964) donde se emplea como sustrato de la enzima el pirogalol. Para ello, se determinó la velocidad de la reacción de oxidación del sustrato por la enzima PPO. El pirogalol fue preparado en tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.5. Para la lectura se adicionaron 50 µL del extracto enzimático a una mezcla de reacción que consistió en 450 µL tampón acetato de sodio y 2.5 mL pirogalol 20 mM. La actividad de la enzima, se determinó de igual forma que en el procedimiento anterior, pero a 420 nm donde absorbe el pirogalol oxidado. El blanco fue preparado en igual forma que para las POX. Se tomó la variación de la densidad óptica DO en el tiempo, durante un minuto a intervalos de 5 seg realizando tres repeticiones por tratamiento. El cálculo de la actividad enzimática general fue expresada en:

mmoles (mM) de producto formado (quinona) por minuto (min) por microgramos (μg) de proteína que se calculó mediante la expresión descrita para POX pero usando el para las PPO.

Actividad enzimática de β -1,3-glucanasas, la cuantificación de la actividad de la actividad de la Glucanasa, se procedió según el método colorimétrico discontinuo de Somogy-Nelson (Somogy 1952) con algunas modificaciones. Para ello, se usó laminarín (β -1,3 glucano, 2 mg.mL^{-1}) como sustrato, preparado en tampón acetato de potasio 50 mM pH 5.5. La mezcla de reacción consintió $15 \mu\text{L}$ del extracto enzimático y $15 \mu\text{L}$ de laminarín y fue incubada a 37°C durante 30 min. La velocidad de la reacción se calculó a partir de las lecturas de absorbancia a 660 nm , determinando los azúcares reductores. La curva patrón se realizó utilizando distintas concentraciones de glucosa como estándar a partir de una solución de 1 mg.mL^{-1} , siguiendo el mismo procedimiento descrito para las PT. El cálculo de la actividad enzimática se realizó mediante la expresión:

$$\text{Actividad enzimática} = \text{D.O/t} * \cot (\text{v. r/ v. m}) * \text{dil}$$

Donde:

D.O: variación en la densidad óptica de cada repetición.

t: tiempo de incubación

cot: cotangente de la curva patrón

v.r: Volumen total de la reacción.

v.m: Volumen de la muestra

dil: dilución

El cálculo de la actividad enzimática fue expresado en mmoles (mM) de producto formado (glucosa) por minuto (min) por microgramos (μg) de proteína.

Análisis estadístico, los resultados obtenidos para cada caso, se sometieron a un análisis de varianza

con un nivel de significación del 5%, cuando se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey, para ello se utilizó el programa estadístico STATISTIX versión 8.0 (Statistix 2003), con el objetivo identificar, el efecto de los tratamientos sobre las actividades enzimáticas de las POX, PPO y Glucanasas.

Resultados

Actividad enzimática de peroxidada (POX), la Figura 1 muestra el efecto de los diferentes tratamientos en plantas de ajo de quince días de edad en muestras analizadas a los 3, 5, 7, 9, 10, 15 y 20 dpi donde se observó que las alternativas solas lograron inducir la enzima peroxidasa (POX) y superaron el mayor pico de actividad del testigo (Tes). La mayor actividad enzimática (AE) en las plantas tratadas con *Trichoderma koningiopsis* (T) y Bion (B) se evidenció a los 7 dpi cuando se les comparó con el Tes.

El tratamiento T logró destacarse a partir de los 10 dpi hasta el 20 dpi, mientras que en las plantas tratadas con B la AE asciende nuevamente a los 15 dpi y se mantiene hasta el último día del análisis. La AE inducida por el patógeno (S) además de expresarse de forma precoz, superó la expresión de la enzima en los tratamientos descritos a los 9 dpi, decrece y posteriormente comenzó a ascender a los 20 dpi.

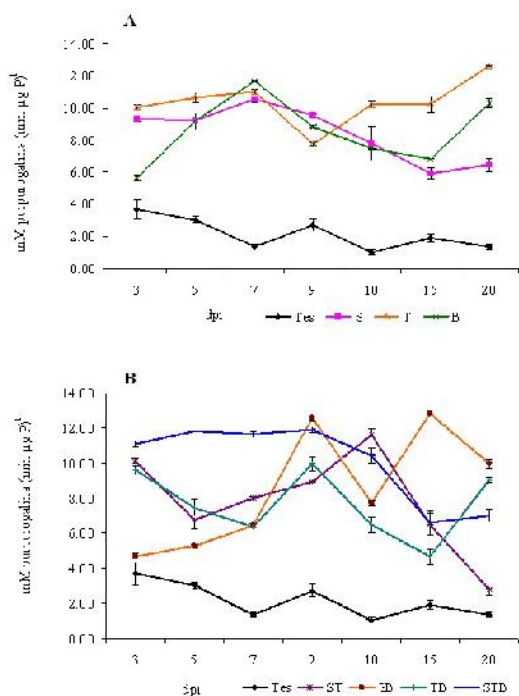


Figura 1 Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de peroxidasas en hojas de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) de 15 días de edad en muestras analizadas a los 3, 5, 7, 9, 10, 15 y 20 días postaplicación de los inductores (dpi) a) (TES) plantas testigo a los 3dpi, (S) *Sclerotium cepivorum*, (T) *Trichoderma koningiopsis*, (B) Bion, b) (ST) *S. cepivorum* + *T. koningiopsis*, (SB) *S. cepivorum* + Bion, (TB) *T. koningiopsis* + Bion, (STB) *S. cepivorum* + *T. koningiopsis* + Bion. Las barras indican la desviación estándar alrededor de la media.

La Figura 1b muestra la AE de las POX cuando se aplicaron los tratamientos combinados. Las curvas mostraron que la variable evaluada se mostró elevada a los 9 dpi y mostró dos picos de actividad en aquellas alternativas donde se aplicó el inductor químico tanto con el antagonista como con el patógeno (SB, TB y STB) permaneciendo hasta los 15 dpi, mientras que la combinación ST provocó el aumento a partir de los 10 dpi disminuyendo drásticamente. Por otro lado, los tratamientos T y STB promovieron una respuesta superior a la inducida por S.

Los resultados evidenciaron, que todos los tratamientos inducen la expresión de la enzima de for-

ma temporal, no obstante, al comparar los resultados de las curvas de ambas figuras se observó, que en aquellas alternativas donde se emplearon las diferentes combinaciones, se indujo en la planta una respuesta más rápida y por un período prolongado al compararlo con los tratamientos solos y el Tes.

La Figura 2 muestra el efecto de los diferentes tratamientos en plantas de ajo de quince días de edad sobre el patrón isoenzimático de peroxidasas en muestras analizadas a los 10 y 15 dpi. En la Figura 2a se pudo apreciar que los tratamientos provocaron la aparición de 4 isoformas de POX (P1, P2, P3 y P4). Las bandas identificadas como P1 y P2 que mostraron un Peso Molecular comprendido entre 25 y 50 kDa, revelaron bandas más intensas en aquellas las plantas tratadas con T, SB y STB para las mismas isoformas, al compararlas con Test y el resto de los tratamientos y coincidiendo con el análisis de AE.

Por otra parte, las plantas tratadas con STB presentaron 2 isoformas adicionales (P3 y P4) con un alto grado de expresión y un PM cercano a 40 kDa, dichas isoformas no se descubrieron en el resto de las alternativas y probablemente contribuyeron con mayor fuerza a la resistencia inducida ya que en este tratamiento también evidenció la mayor AE cuando fue comparada con esa variable. Las muestras de hojas tomadas a partir de plantas tratadas con los tratamientos T, ST, SB y STB mostraron a los 15 dpi, un perfil de bandas semejantes entre sí y revelaron la presencia de dos isoformas (P1 y P2). Las muestras de las plantas sometidas a los tratamientos B y TB evidenciaron un perfil de bandas con dos isoformas diferentes.

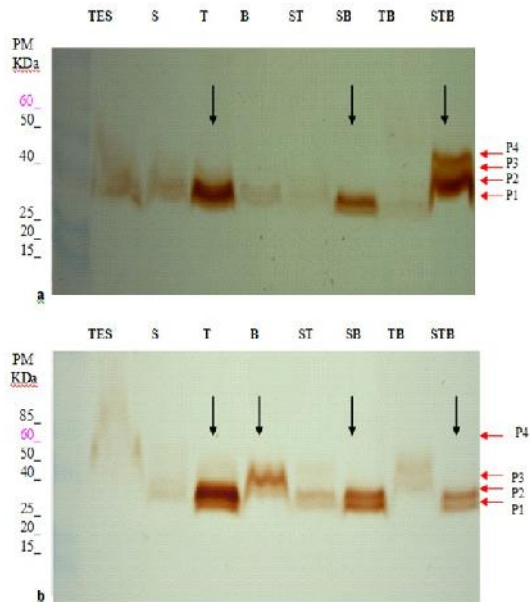


Figura 2 Patrón isoenzimático de peroxidasas en hojas de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) de 15 días de edad inoculadas con los diferentes tratamientos a) muestras analizadas a los 10 días post aplicación de los inductores (dpi) B) muestras analizadas a los 15 dpi. PM marcador de peso molecular (kD) a) (TES) plantas testigo a los 3dpi. (S) *Sclerotium cepivorum*, (T) *Trichoderma koningiopsis*, (B) Bion, b) (ST) *S. cepivorum* + *T. koningiopsis*, (SB) *S. cepivorum* + Bion, (TB) *T. koningiopsis* + Bion, (STB) *S. cepivorum* + *T. koningiopsis* + Bion. Las flechas indican las bandas formadas donde se observa el incremento o la disminución de intensidad correspondiente a la enzima. P1, P2, P3 y P4 isoformas de peroxidasas.

Es importante destacar que el tratamiento T provocó la expresión de tres isoformas de POX (P1, P2 y P3) a los 10 dpi conservando su intensidad hasta los 15 dpi, cuando se le comparó con testigo y el resto de las opciones, indicando que la respuesta defensiva de la planta ante el inductor biológico perduró por mayor tiempo comparado con la permanencia del químico.

Actividad enzimática de polifenol oxidasa (PPO).

La Figura 3 muestra los resultados correspondientes a la actividad de la enzima PPO, producida por las plantas de ajo de 15 días de edad, en muestras analizadas a los 3, 5, 7, 9, 10, 15 y 20 dpi. En la

Figura 3a se observa que todas las alternativas empleadas lograron inducir la enzima PPO superando el mayor pico de actividad del testigo. La mayor AE de las PPO se evidenció desde los 3 dpi en las plantas tratadas con T, con un descenso a los 7 dpi, iniciando su ascenso a los 9 dpi cuando alcanzó su mayor pico de actividad al compararlas con el resto de las opciones. A partir de este momento la variable se mantuvo hasta el último día de análisis. Las plantas que recibieron B también evidenciaron elevados niveles de PPO a los 9 dpi, posteriormente la AE decayó e inició nuevamente su ascenso, a los 20 dpi en concordancia con el comportamiento de las POX en esta opción y ambas alternativas superaron al patógeno (S). (P3 y P4) cuando se les comparó con el resto de las alternativas y concordando con la AE.

La Figura 3b mostró que la AE de las PPO aumentaron desde el tercer dpi para las alternativas donde se combinó el patógeno con los inductores bióticos y abióticos (SB y STB). Los niveles de la enzima se mantuvieron en los tratamientos ST y STB hasta los 9 y 10 dpi respectivamente, a partir de este momento la AE declinó de manera abrupta a los 15 dpi. Por otra parte, se detectó una modificación en el comportamiento de la AE con la aplicación de la alternativa TB donde se evidenciaron dos picos de actividad más tarde a los 5 dpi y a los 9 y 15 dpi, respectivamente y SB.

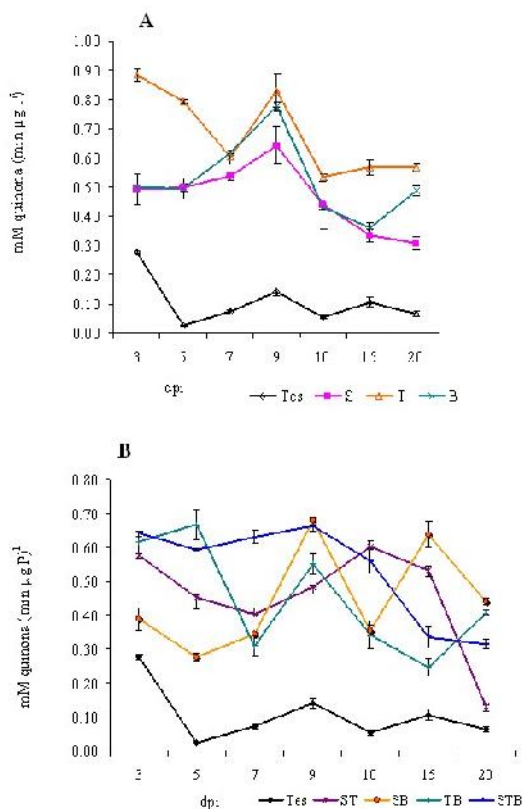


Figura 3 Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de polifenol oxidasa PPO en hojas de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) de 15 días de edad en muestras analizadas a los 3, 5, 7, 9, 10, 15 y 20 días post aplicación de los inductores (dpi). a) (TES) plantas testigo a los 3dpi. (S) *Sclerotium cepivorum*, (T) *Trichoderma koningiopsis*, (B) Bion, b) (ST) *S. cepivorum* + *T. koningiopsis*, (SB) *S. cepivorum* + Bion; (TB) *T. koningiopsis* + Bion; (STB) *S. cepivorum* + *T. koningiopsis* + Bion. Las barras indican la desviación estándar alrededor de la media.

Durante el desarrollo del análisis se observó, que cuando se aplicaron los inductores solos o combinados, la etapa de mayor AE ocurrió a los 9 dpi, no obstante, cuando se aplicaron las alternativas ST y STB se evidenció que la AE fue sostenida sin mostrar picos de actividad, mientras que SB y TB evidenciaron dos picos de actividad.

Actividad enzimática de β -1,3-glucanasas. La Figura 4 muestra los resultados correspondientes al efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de las Glu en muestras analizadas a los 3, 5, 7, 9, 10, 15 y 20 dpi, observándose que todas las alternativas empleadas lograron

inducir las Glu superando el mayor pico de actividad observada en el testigo. La Figura 4a expuso que la mayor AE de las Glu ocurrió a los 15 dpi en las plantas tratadas con T y B, mientras que, en las plantas inoculadas con el patógeno sólo, el aumento de la actividad enzimática se produjo desde los 15 dpi, posterior a este tiempo, se redujo drásticamente.

En la Figura 4b se observa que las alternativas ST y TB indujeron la expresión de la enzima de forma temprana, desde los 3 dpi, alcanzada el nivel más alto a los 15 dpi, y disminuyendo a los 20 dpi.

La Figura 4c muestra que la AE de las Glu en los tratamientos SB y STB fue la más alta a los 3 dpi e incrementó a partir de los 7 hasta los 10 dpi, manifestando el mayor pico de actividad a los 9 dpi. A partir de este momento, la AE inició su descenso de forma abrupta y comenzó a ascender nuevamente a los 15 y 20 dpi, respectivamente.

Al comparar los resultados, de las curvas de ambas figuras se observó, que las alternativas donde se emplearon los inductores solos (T y B) y las combinaciones SB y STB indujeron la expresión de la enzima antes que lo hiciera el patógeno, mientras que los tratamientos ST y TB si bien lograron elevados niveles de AE, estos se expresaron tardíamente.

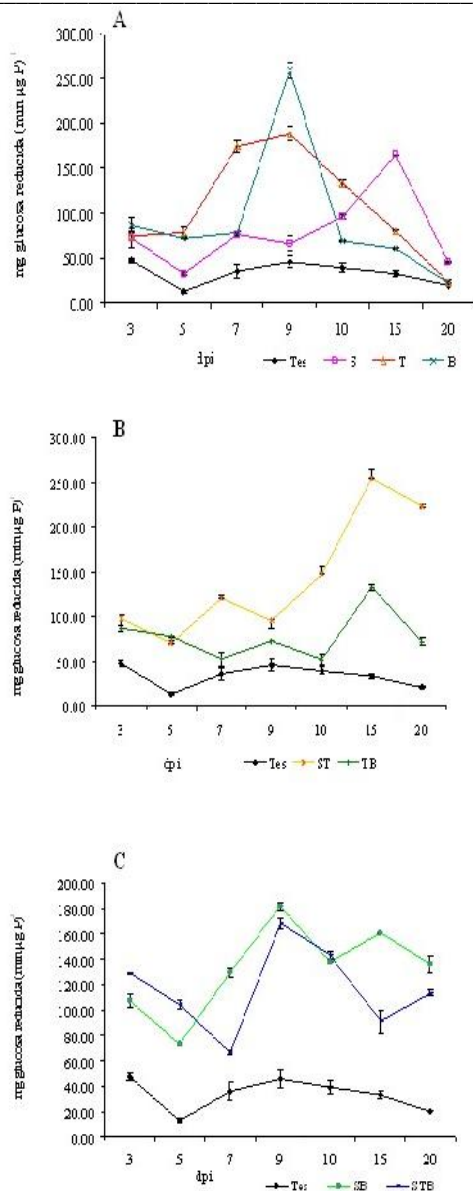


Figura 4 Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad enzimática de la β -1,3-glucanasas en hojas de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) de 15 días de edad en muestras analizadas a los 3, 5, 7, 9, 10, 15 y 20 días postaplicación de los inductores (dpi) a) (TES) plantas testigo a los 3dpi. (S) *Sclerotium cepivorum*, (T) *Trichoderma koningiopsis*, (B) Bion, b) (SB) *S. cepivorum* + Bion; (STB) *S. cepivorum* + *T. koningiopsis* + Bion c) (ST) *S. cepivorum* + *T. koningiopsis*, (TB) *T. koningiopsis* + Bion. Las barras indican la desviación estándar alrededor de la media.

Discusión

Las plantas tratadas con el inductor biótico y el químico, en los distintos períodos, provocó las respuestas de defensa en las plantas de ajo tanto a nivel local como sistémico. Debió darse una señal de móvil generada en el sitio de la inducción y fue trasladada por la planta, dando lugar a un estado inducido distante del lugar de la exposición al antagonista y el químico. Además, se comprobó la compatibilidad entre el biocontrolador y el compuesto con la planta y entre el antagonista y el inductor químico. Adicionalmente se demostró que existe relación entre el inductor de resistencia empleado y el tiempo en que se produce la expresión de la respuesta.

La actividad enzimática de las POX, PPO y Glu en el presente estudio, constituyeron un marcador bioquímico idóneo para determinar la activación de los mecanismos de defensa en las plantas de ajo.

El incremento de la expresión de POX, permitió estimar la forma rápida y directa en la respuesta de esta proteína y se observó que el período de respuesta entre la aplicación del inductor biótico y abiótico y la activación eficaz de las respuestas de defensa promovida por las POX ocurre a los 3-7 días después de la inoculación. Los cambios detectados en los análisis isoenzimáticos revelaron la sensibilidad del método para indicar la respuesta defensiva cuando los niveles de la enzima son muy bajo para ser cuantificados.

En los resultados expuestos en dicho análisis se puede señalar, que el tratamiento donde se aplicaron el inductor biótico, abiótico y el patógeno se presentó la mayor de los mecanismos de defensa del hospedante en el tiempo, sin embargo, debe

considerarse la viabilidad y la adaptación del inóculo empleado de *T. Koningiopsis*.

Por otra parte, la respuesta defensiva de la planta ante el antagonista perduró por mayor tiempo en comparación con el químico. Estudios previos demostraron que cuando las plantas son tratadas con inductores, las enzimas pueden estar de forma constitutiva en el hospedante y aumentan su actividad como resultado de la activación de la respuesta de defensa, mientras que la aparición de nuevas isoformas, podría ser consecuencia de su inducción ante la presencia del patógeno (Yedidia *et al.* 1999, Howell *et al.* 2000, Howell 2003, Harman *et al.* 2004).

La respuesta de PPO se mostró de forma prematura al tratar a las plantas con ambos inductores combinados detectándose que sus niveles se mantuvieron por mayor tiempo. Este aumento en la actividad de esta enzima pudiera corresponder a una respuesta inespecífica por parte del hospedante ante la presencia de los inductores. Es posible que la respuesta defensiva requiera de la síntesis y acumulación de la enzima antes de alcanzar niveles máximos, o que las dosis empleadas tanto del compuesto químico como del hongo antagonista hayan sido muy pequeñas para inducir una respuesta.

En el presente estudio se pudo comprobar que la expresión todas las enzimas evaluadas obtuvo los niveles más elevados cuando las plantas fueron tratadas con el inductor químico sólo y el inductor biótico previo a la aplicación del patógeno. Estos resultados, sugieren que la planta evidenció mayor estímulo defensivo por el efecto aditivo de los inductores, sugiriendo que la inducción de resistencia probablemente no se debió a una enzima en particular, sino al grupo en conjunto.

Las plantas tratadas con ambos inductores y luego inoculadas con el patógeno, lograron responder más rápido y de manera superior con respecto a aquellas donde se aplicaron los inductores pero que no fueron desafiadas, trabajos semejantes al presente señalaron que la pre-activación del sistema defensa de la planta, desempeñan un papel fundamental en el inicio de la respuesta inmune de la planta, garantizando el reconocimiento y la modificación postrasduccional de la señal (Van Wees *et al.* 2008) o un nuevo estrés (Conrath *et al.* 2006).

Los resultados de la presente investigación demostraron que la combinación de Bion® y *T. Koningiopsis*, son efectivos induciendo una respuesta tipo RSA y RSI que permaneció hasta un período de 20 días posteriores a la inducción, permitiendo mantener a la planta bajo una protección efectiva de al menos 15 días después de su aplicación. El manejo de la enfermedad puede llevarse a cabo entonces mediante la producción de sustancias que activen los mecanismos defensivos en las plantas, y demostrar que para una aplicación idónea y el uso eficiente de controladores biológicos e inductores de resistencia se requiere incluir el estudio molecular de los aislados.

De acuerdo con el objetivo planteado y los resultados obtenidos en la investigación realizada se llegó a las siguientes conclusiones.

La incorporación de *T. koningiopsis* y Bion® en las plantas de ajo, mostraron que tanto el antagonista como el compuesto lograron promover a las enzimas evaluadas y superaron la actividad frente al Tes y la opción STB logró superar en tiempo y cantidad la expresión enzimática provocada por el patógeno sólo.

La expresión de las enzimas evaluadas reveló que el 5 y 9 dpi son cruciales para la activación de los

mecanismos de defensa, apuntando que la aplicación de los inductores debe realizarse cada 7 o 10 días ya que en la mayoría de las alternativas empleadas en el presente estudio comenzaron a decaer a partir de los 15 días posteriores a la inducción. Todos estos resultados permiten a proponer que el empleo de nuevas aplicaciones o estrategias debe realizarse previas a ese momento, de manera de ejercer inducción de forma continua.

Se requiere de investigaciones adicionales para determinar si la IR provocada por los inductores empleados pueden ser superados con otras dosis, compuestos y momentos de aplicación y si dichas respuestas están influenciadas por el genotipo del hospedante y/o las condiciones ambientales. De igual modo, verificar si durante la IR mediada puede haber expresión de genes sin la traducción o síntesis de la enzima relacionada con la defensa.

Conflictos de interés

Esta investigación recibió financiamiento del CDCHT /UCLA Lara, Venezuela, y no presenta conflictos de interés.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo De Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” por financiamiento de la presente investigación bajo el código 020 AG-2008.

Literatura citada

- Alexander A. Sucrose enzyme relationship in immature sugar cane. *Journal Agriculture*. Universidad de Puerto Rico. 1964; 4813:165-231.
- Bradford M. The Bradford assay. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72:248.
- Brix H, Zinkernagel V. Screening for resistance of *Allium* species to *Sclerotium cepivorum* with special reference to non stimulatory resistance. *Plant Pathology*. 1992; 41:308-16.
- Cañedo V, Ames T. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 2004; 62 pp.
- Cavalcanti L, Resende M. Effect of time and dosage of acibenzolar-S-methyl applications in inducing resistance to *Verticillium* wilt in cocoa seedlings. *Fitopatol Bras*. 2005; 30(1):67-71.
- Chacón M, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell A, *et al.* Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *Int Microbiol*. 2007; 10:19-27.
- Clarkson J, Scruby A, Mead A, Wright C, Smiyh B, Whipps M. Integrated control of *Allium* white rot with *Trichoderma viride*, Tebuconazole and composted onion waste. *Plant Pathology* 2006; 55:375-386.
- Conrath U, Pieterse C, Mauch-Mani B. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006; 19:1062-1071.
- Coventry E, Noble R, Mead A, Martin F, Perez J, Whipps J. *Allium* white rot suppression with composts and *Trichoderma viride* in relation to sclerotia viability. *Phytopathology*. 2006; 96(10):1009-1020.

- Delgadillo F, Zavaleta E, Osada S, Arévalo A, Valenzuela V, González D, *et al.* Densidad de inoculo de *Sclerotium cepivorum* y su control mediante Tebuconazole en ajo (*Allium sativum* L.). Rev Fitotec Mex. 2002; 25:349-354.
- Diekmann M. FAO/IPGRI. Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm N° 18. *Allium* spp. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Roma. 1997; 60 pp.
- Durrant W, Dong X. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 2004; 42:185-209.
- Fernández-Larrea O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica. 2001; 62:96-100.
- Frick F. Oxidative enzymes. In: Physiological Plant Pathology. Encyclopedia of Plant Pathology, New Series. Edited by Heitefuss R, Williams P.H. 1976; 4:617-627.
- Gorlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel K, *et al.* Benzothiadiazole, a Novel Class of Inducers of Systemic Acquired Resistance, Activates Gene Expression and Disease Resistance in Wheat. Plant Cell. 1996; 8:629-643.
- Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2004; 2:43-56.
- Howell C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and evolution of current concepts. Plant Dis. 2003; 87:4-10.
- Howell C, Hanson L, Stipanovic R, Puckhaber L. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology. 2000; 90:248-252.
- Jiménez M, Arcia A, Ulacio D, Hernández A. Evaluación de *Trichoderma* spp. y Acibenzolar-S-Metil (Bion®) como inductores de resistencia a la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones de campo. J Selva Andina Res Soc. 2012; 3(1):14-25.
- Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1971; 190:227:680-685.
- Moreno B, Acevedo R. Caracterización patogénica y estudio de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk. Rev Iberoam Micol. 2002; 19:115-119.
- Nelson P. Greenhouse operation and management. 4 ed. Prentice-Hall. Estados Unidos de América. 1991; 612 pp.
- Obregon M. Evaluación *in vitro* del poder antagónico de *Trichoderma harzianum* Rifai con respecto al hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berkeley causante de la enfermedad "Torbó en cebolla". In: XLVII Reunión Anual del PCCMCA Resúmenes. San José, Costa Rica. 2001; 19 pp.
- Papavizas, G. Isolation and enumeration of propagules of *Sclerotium cepivorum* from soil. Phytopathology .1972; 62:545-549.
- Resende M, Nojosa G, Aguilar M, Silva L, Niella G, Carvalho G, *et al.* Perspectivas da indução de resistência em cacaueiro contra *Crinipellis pernicioso* através do Benzotiadiazole (BTH). Fitopatol Bras. 2000; 25:149-156.
- Sánchez-Pale J, Zavaleta-Mejía E, Mora-Aguilera G, Pérez-Moreno L. Patogenicidad de cuatro aislamientos mexicanos de *Sclerotium cepivo-*

- rum* berk. en tres cultivares de ajo (*Allium sativum* L.) Agrociencia. 2002; 36:103-113.
- Segarra G, Casanova E, Bellido D, Odena M, Oliveira E, Trillas E. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. Proteomics. 2008; 7:3943-52.
- Shores M, Harman G. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. Plant Physiology. 2008; 147:2147-63.
- Statistix. Statistix for Windows versión 8.0. User's Manual. Analytical Software. Tallahassee, FL, USA. 2003.
- Somogy M. Notes on sugar determination. J Biol Chem. 1952; 195:19-23.
- Van Loon L, Van Strien E. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 1999; 55:85-97.
- Van Wees S, Van Der Ent S, Pieterse C. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. Curr Opin Plant Biol. 2008; 11:443-448.
- Yedidia I, Benhamou N, Chet I. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol. 1999; 65:1061-1070.
-